

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 8 月 2 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 5 0 7 2 8
Application Number:

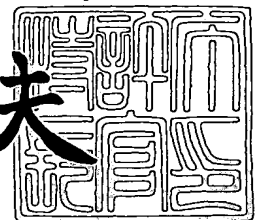
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 2 5 0 7 2 8]

出 願 人 伊 東 恭 悟
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 1 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 5 8 6 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP01-1083

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/11
A61K 38/04

【発明の名称】 腫瘍抗原

【請求項の数】 23

【発明者】

【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台 2 丁目 2 5 番地 9 号

【氏名】 伊東 恭悟

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県久留米市東櫛原町 4 7 - 3 アーサー櫛原リベッ
クス 6 0 8 号

【氏名】 七條 茂樹

【特許出願人】

【識別番号】 596094371

【氏名又は名称】 伊東 恭悟

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書
【発明の名称】 腫瘍抗原
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 2】 配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり、HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド。

【請求項 3】 配列表の配列番号 43 若しくは配列番号 44 に記載のアミノ酸配列からなり、HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド。

【請求項 4】 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドからなる医薬。

【請求項 5】 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する癌ワクチン。

【請求項 6】 食道癌または大腸癌の治療に用いる請求項 5 に記載の癌ワクチン。

【請求項 7】 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する細胞傷害性 T 細胞の誘導剤。

【請求項 8】 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを使用することを特徴とする細胞傷害性 T 細胞の誘導方法。

【請求項 9】 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、または配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項 10】 配列表の配列番号 45 から配列番号 47 のいずれか 1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが HLA-A26 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項 11】 配列表の配列番号 48 若しくは配列番号 49 に記載の塩基

配列からなるポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドがHLA-A2拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項12】 請求項9から11のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項13】 請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

【請求項14】 組換えベクターが発現組換えベクターである請求項13に記載の組換えベクター。

【請求項15】 請求項13または14に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項16】 請求項14に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、請求項2または3に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項17】 請求項1に記載のペプチドまたは請求項2若しくは3に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項18】 配列表の配列番号1から配列番号21のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号40から配列番号42のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび／またはHLA-A26と相互作用して少なくともHLA-A26拘束性細胞傷害性T細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、配列表の配列番号22から配列番号39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号43若しくは配列番号44に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび／またはHLA-A2と相互作用して少なくともHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、および／または請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物の、スクリーニング方法であって、請求項1に記載のペプチド、請求項2若しくは

3に記載のポリペプチド、請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、請求項13若しくは14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、または請求項17に記載の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項19】 請求項18に記載のスクリーニング方法により得られた化合物。

【請求項20】 配列表の配列番号1から配列番号21のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号40から配列番号42のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの少なくとも1つに対するHLA-A26拘束性細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、配列表の配列番号22から配列番号39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号43若しくは配列番号44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの少なくとも1つに対するHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、または請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物。

【請求項21】 請求項1に記載のペプチド、請求項2若しくは3に記載のポリペプチド、請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖、請求項13または14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、請求項17に記載の抗体、および請求項19または20に記載の化合物のうちの少なくとも1つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物。

【請求項22】 請求項1に記載のペプチド、請求項2若しくは3に記載のポリペプチド、または請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法。

【請求項23】 請求項18または22に記載の方法に使用する試薬キットであって、請求項1に記載のペプチド、請求項2若しくは3に記載のポリペプチド、請求項9から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または請求項17に記載の抗体を少なくとも1つ以上含んでなる試薬キッ

ト。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、腫瘍抗原に関し、さらに詳しくは腫瘍特異的細胞傷害性T細胞により認識されるペプチドまたはポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドまたは該ポリペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ペプチドおよび／または該ポリペプチドからなる細胞傷害性T細胞誘導剤、およびこれらの1種以上を含む医薬組成物、該ポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドを用いる細胞傷害性T細胞の誘導方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの測定方法、並びに該スクリーニング方法または該測定方法に使用する試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体における癌の排除には免疫系、特に細胞傷害性T細胞（C y t o t o x i c T L y m p h o c y t e）（以下、CTLと略称することもある）が重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示す細胞傷害性T細胞の浸潤が認められている（A r c h . S u r g . 126:200～205, 1990）。この腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞の標的分子（腫瘍抗原）は、メラノーマにおいて初めて発見された。腫瘍細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて8～11個のアミノ酸からなるペプチド（腫瘍抗原ペプチド）になり、主要組織適合性抗原であるヒト白血球抗原（HLA）分子と結合して腫瘍細胞表面上に提示される。細胞傷害性T細胞はHLAと腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識して腫瘍細胞を傷害する。すなわち、細胞傷害性T細胞はHLA拘束性に腫瘍抗原ペプチドを認識する。

【0003】

H L Aは細胞膜抗原であり、ほとんど全ての有核細胞上に発現している。H L Aはクラス I 抗原とクラス II 抗原に大別されるが、細胞傷害性 T 細胞により抗原ペプチドとともに認識される H L Aはクラス I 抗原である。H L Aクラス I 抗原はさらに H L A-A、H L A-B、または H L A-C 等に分類され、ヒトでは有核細胞がそれぞれ異なった量の H L A-A、H L A-B、または H L A-C を有している。また、その遺伝子は多型性に富むことが報告されている。例えば、H L A-A には A 1、A 2、A 24、および A 26 等の、H L A-B には B 8、B 27、および B 46 等の、H L A-C には C w 3 や C w 6 等の多型が存在する。そのため、それぞれのヒトが有する H L Aの型は必ずしも同一ではない。また、細胞傷害性 T 細胞は H L Aクラス I 抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するとき、H L Aの型をも認識する。

【0004】

ここにおいて、腫瘍抗原とは腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導および／または活性化し得る、腫瘍細胞由来の蛋白質、ポリペプチド、またはペプチドを意味する。また腫瘍抗原ペプチドとは、腫瘍抗原が腫瘍細胞内で分解されて生じるペプチドであり、H L A分子と結合して細胞表面上に提示されることにより腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導および／または活性化し得るペプチドを意味する。さらに、腫瘍抗原が有する腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導および／または活性化し得るアミノ酸配列の部位を腫瘍抗原エピトープ（腫瘍抗原決定基）という。

【0005】

近年、細胞傷害性 T 細胞により認識され得る腫瘍抗原をコードする多くの遺伝子が、ヒトの癌細胞の c D N A から同定されている (S c i e n c e 254: 1643~1647, 1991) (J. E x p. M e d. 183: 1185~1192, 1996) (J. I m m u n o l. 163: 4994~5004, 1999)。例えば、H E R / n e u (P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 92: 432~436, 1995)、変異 c d k (S c i e n c e 269: 1281~1284, 1995)、そして変異 C A S P - 8 (J. E x p.

Med. 186:785~793, 1997) 等がその例として挙げられるが、これらは増殖性細胞および悪性形質転換体中に含まれる。

【0006】

また、腫瘍拒絶抗原遺伝子やT細胞抗原レセプター（TCR）等の特異免疫に関与する分子が、過去10年において、メラノーマ、食道癌、およびその他の癌で同定されてきており、進行癌または転移性癌のペプチドによる特異的免疫療法が検討されてきている。

【0007】

現在欧米では、腫瘍抗原投与により癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされており、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原 gp100 ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2（IL-2）を静脈注射投与すると、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている（Nature Medicine 4:321, 1998）。このように腫瘍抗原は、ワクチンとして利用することにより、有効な癌治療効果を期待できる。

【0008】

現在、メラノーマを中心として、種々の腫瘍抗原遺伝子およびそれらがコードする腫瘍抗原ペプチドが同定されている。しかし、癌の多様性を考えた場合、全ての癌細胞において同一の腫瘍抗原が同程度発現されているとは考えられない。また、HLAの型によって結合し得るペプチドが異なるため、細胞傷害性T細胞を誘導および／または活性化するためには、該細胞傷害性T細胞が認識する型のHLAに結合し得る腫瘍抗原ペプチドを選択することが重要である。

【0009】

もちろん、単一の腫瘍抗原を用いて細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法によっても、該腫瘍抗原を有する癌の治療効果は得られる。しかし、癌の治療において腫瘍抗原に特異的な細胞傷害性T細胞を誘導・活性化し、かつ癌の多様性に対応して高い治療効果を得るためには、HLA拘束性および癌の多様性に応じた数多くの新たな腫瘍抗原を発見し利用することが必要である。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、新規な腫瘍抗原を見出し提供することである。具体的には少なくともHLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原を提供することである。さらに詳しくはHLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞によって認識されるペプチドまたはポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドまたは該ポリペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ペプチドおよび／または該ポリペプチドからなる細胞傷害性T細胞誘導剤、およびこれらの1種以上を含む医薬組成物、該ポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドを用いる細胞傷害性T細胞の誘導方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの測定方法、並びに該スクリーニング方法または該測定方法に使用する試薬キットを提供することである。

【0011】**【課題解決のための手段】**

本発明者は、食道癌患者由来の腫瘍浸潤リンパ球（Tumour-Infiltrating Lymphocyte）（TIL）からHLA-A26と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A26拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞KE4-CTLを、また、大腸癌患者由来のTILからHLA-A2と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞OK-CTLを樹立し、これらの細胞を利用して、HLA-A26拘束性にKE4-CTLを活性化し得る腫瘍抗原およびHLA-A2拘束性にOK-CTLを活性化し得る腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法により、それぞれヒト食道癌細胞株KE4またはヒト大腸癌細胞株SW620のcDNAライブラリーから単離・同定し、さらにHLA-A26拘束性またはHLA-A2

拘束性細胞傷害性T細胞により認識される該腫瘍抗原のエピトープを有するポリペプチドまたはペプチドを見い出して本発明を完成した。

【0012】

すなわち本発明は、

(1) 配列表の配列番号1から配列番号39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(2) 配列表の配列番号40から配列番号42のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなり、HLA-A26拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチド、

(3) 配列表の配列番号43若しくは配列番号44に記載のアミノ酸配列からなり、HLA-A2拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチド、

(4) 配列表の配列番号1から配列番号39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号40から配列番号42のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなりHLA-A26拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号43若しくは44に記載のアミノ酸配列からなりHLA-A2拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる1種以上のペプチドまたはポリペプチドからなる医薬

(5) 配列表の配列番号1から配列番号39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号40から配列番号42のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなりHLA-A26拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号43若しくは44に記載のアミノ酸配列からなりHLA-A2拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる1種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する癌ワクチン、

(6) 食道癌または大腸癌の治療に用いる前記(5)の癌ワクチン、

(7) 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり H L A - A 2 6 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり H L A - A 2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを含有する細胞傷害性 T 細胞の誘導剤、

(8) 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり H L A - A 2 6 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、並びに配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり H L A - A 2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドから選ばれる 1 種以上のペプチドまたはポリペプチドを使用することを特徴とする細胞傷害性 T 細胞の誘導方法、

(9) 配列表の配列番号 1 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり H L A - A 2 6 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド、または配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなり H L A - A 2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(10) 配列表の配列番号 45 から配列番号 47 のいずれか 1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが H L A - A 2 6 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(11) 配列表の配列番号 48 若しくは配列番号 49 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが H

HLA-A2 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび／または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(12) 前記 (9) から (11) のいずれかのポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

(13) 前記 (9) から (12) のいずれかのポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター、

(14) 組換えベクターが発現組換えベクターである前記 (13) の組換えベクター、

(15) 前記 (13) または (14) の組換えベクターにより形質転換された形質転換体、

(16) 前記 (14) の組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、前記 (2) または (3) のポリペプチドの製造方法、

(17) 前記 (1) のペプチドまたは前記 (2) 若しくは (3) のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体、

(18) 配列表の配列番号 1 から配列番号 21 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号 40 から配列番号 42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび／または HLA-A26 と相互作用して少なくとも HLA-A26 拘束性細胞傷害性 T 細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、配列表の配列番号 22 から配列番号 39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号 43 若しくは配列番号 44 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび／または HLA-A2 と相互作用して少なくとも HLA-A2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による該ペプチド若しくは該ポリペプチドの認識を増強する化合物、および／または前記 (9) から (12) のいずれかのポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物の、スクリーニング方法であって、前記 (1) のペプチド、前記 (2) 若しくは (3) のポリペプチド、前記 (9) から (12) のいずれかのポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、前記 (13) 若しくは (14) の組換えベクター、前記 (15) の形質転換体

、または前記（１７）の抗体のうちの少なくとも１つを用いることを特徴とするスクリーニング方法、

（１９）前記（１８）のスクリーニング方法により得られた化合物、

（２０）配列表の配列番号１から配列番号２１のいずれか１に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号４０から配列番号４２のいずれか１に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの少なくとも１つに対する H L A－A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞による認識を増強する化合物、配列表の配列番号２２から配列番号３９のいずれか１に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号４３若しくは配列番号４４のいずれか１に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの少なくとも１つに対する H L A－A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞による認識を増強する化合物、または前記（９）から（１２）のいずれかのポリヌクレオチド若しくはその相補鎖と相互作用してその発現を増強する化合物、

（２１）前記（１）のペプチド、前記（２）若しくは（３）のポリペプチド、前記（９）から（１２）のいずれかのポリヌクレオチドまたはその相補鎖、前記（１３）または（１４）の組換えベクター、前記（１５）の形質転換体、前記（１７）の抗体、および前記（１９）または（２０）の化合物のうちの少なくとも１つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物、

（２２）前記（１）のペプチド、前記（２）若しくは（３）のポリペプチド、または前記（９）から（１２）のいずれかのポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法、

（２３）前記（１８）または（２２）の方法に使用する試薬キットであって、前記（１）のペプチド、前記（２）若しくは（３）のポリペプチド、前記（９）から（１２）のいずれかのポリヌクレオチド若しくはその相補鎖、または前記（１７）の抗体を少なくとも１つ以上含んでなる試薬キット、
からなる。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

（腫瘍抗原遺伝子の単離・同定）

本発明者らは、まず日本人の多数において見られるHLAの型であるHLA-A26およびHLA-A2に注目し、HLA-A26と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A26拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞KE4-CTLおよびHLA-A2と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞OK-CTLを、文献(Int. J. Cancer, 81:457-466, 1999)(J. Immunol. 163:4994-5004, 1999)に記載の方法に従って、それぞれ食道癌患者(HLA-A2601/2402)または大腸癌患者(HLA-A0207/3101)の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)から樹立した。

【0014】

得られたKE4-CTLを用いて、KE4-CTLに認識される腫瘍抗原を、ヒト食道癌細胞株KE4(HLA-A2601/2402)のcDNAライブラリーから、遺伝子発現クローニング法を用いて単離・同定した。すなわち、ヒト食道癌細胞株KE4のcDNAとHLA-A2601のcDNAとをVA13細胞に共遺伝子導入し、該導入遺伝子が発現された細胞のうちKE4-CTLのインターフェロン- γ (IFN- γ)産生を促進するものを選択することにより、CTLに認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子を同定した。

また、OK-CTLを用いて、上記同様に、OK-CTLに認識される腫瘍抗原をヒト大腸癌細胞株SW620(HLA-A0201/A2402)のcDNAライブラリーから単離・同定した。すなわち、ヒト大腸癌細胞株SW620のcDNAとHLA-A0207のcDNAとをサル腎細胞株COS-7に共遺伝子導入し、該導入遺伝子が発現された細胞のうちOK-CTLのIFN- γ 産生を促進するものを選択することにより、CTLに認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子を同定した。

その結果、HLA-A26拘束性のKE4-CTLにより認識されるcDNAクローンを3個得た。以下、これらのcDNAクローンをそれぞれKE4-cl.17、KE4-cl.18、およびKE4-cl.21と呼ぶ。また、HLA-A2拘束性のOK-CTLにより認識されるcDNAクローンを2個得た。以下、これらのcDNAクローンをそれぞれSW620-cl.48およびSW6

20-c1. 121と呼ぶ。具体的な単離・同定方法は後述する実施例に示す。

【0015】

本明細書において、「認識する (recognize)」とは、認識するものが、認識される対象を他のものと見分けて認知し、例えば認知した対象に結合することを意味する。特に、本明細書において、細胞傷害性T細胞 (CTL) が腫瘍細胞あるいは腫瘍抗原ペプチドを認識するとは、CTLがHLAにより提示された腫瘍抗原ペプチドにT細胞受容体を介して結合することを意味する。「活性化する」とは、ある活性若しくは作用を有するものまたは状態を、さらに増強するまたは作動させることを意味する。特に、本明細書において、CTLが活性化するとは、CTLがHLAにより提示された抗原を認識することにより、例えばIFN- γ を産生すること、あるいはCTLが認識した標的細胞に対し細胞傷害性を示すことを意味する。「誘導する」とは、ある活性若しくは作用をほとんど持たないものまたは状態から、該活性若しくは該作用を発生させることを意味する。特に、本明細書において、抗原特異的なCTLを誘導するとは、インビトロあるいはインビボにおいて、ある抗原を特異的に認識するCTLを分化および／または増殖させることを意味する。また、本明細書において細胞傷害性T細胞の誘導剤とは、ある抗原を特異的に認識するCD8陽性T細胞が存在しないあるいは非常に低い割合でしか存在しない状態から、該抗原を認識するCTLが非常に多い割合で存在するような状態へと変化させる作用を示す薬剤を意味する。

【0016】

上記得られたcDNAクローンの塩基配列をダイデオキシヌクレオチドシーケンシング法により決定し、HLA-A26拘束性CTLにより認識されるcDNAクローンの塩基配列を配列表の配列番号45~47に、HLA-A2拘束性CTLにより認識されるcDNAクローンの塩基配列を配列表の配列番号48および49に記載した。これらの塩基配列について、GenBank等の既存のデータベースを用いて相同性検索を行ったところ、それぞれ表1および表2に示すような相同性の高い遺伝子が見い出された。これら相同性の高い遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列は開示されているものの、これらが腫瘍抗原をコードしているという報告はない。以下、これらcDNAが由来したKE4腫瘍細胞ま

たはSW620腫瘍細胞の遺伝子を、それぞれ遺伝子KE4-17、遺伝子KE4-18、遺伝子KE4-21、遺伝子SW620-48、および遺伝子SW620-121と呼ぶ。また、以下で遺伝子産物というときは、各遺伝子がコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。

【0017】

本発明において得られた遺伝子はHLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性の腫瘍特異的CTLにより認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子であり、上記のように細胞で発現させると、HLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性にCTLにより認識され、該CTLを活性化する。これらの遺伝子のコードするアミノ酸配列を、配列表の配列番号40～44に記載した（表1および表2を参照）。

【0018】

【表1】

cDNAクローン (塩基長 bp)	配 列 番 号	コードされる ポリペプチド (アミノ酸長)	配 列 番 号	相同性の高い遺伝子 [GenBankアクセッション番号]
KE4-cl.17 (974)	45	KE4-17- PP (142)	40	ribosomal protein L13a [NM_012423] [XM_027885]
KE4-cl.18 (821)	46	KE4-18- PP (233)	41	ribosomal protein S2 [BC001795]
KE4-cl.21 (741)	47	KE4-21- PP (217)	42	ribosomal protein L10a [BC006791] [AAH06791]

【0019】

【表 2】

cDNAクローン (塩基長 bp)	配 列 番 号	コードされる ポリペプチド (アミノ酸長)	配 列 番 号	相同性の高い遺伝子 [GenBankアクセッション番号]
SW620-cl.48 (1324)	48	SW620-48-PP (361)	43	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3 (SLC25A3) [XM_039619]
SW620-cl.121 (2303)	49	SW620-121-PP (640)	44	aminolevulinate, delta-, synthase 1 (ALAS1) [NM_000688]

【0020】

(腫瘍抗原ペプチドの調製とCTL活性)

腫瘍抗原をコードする上記遺伝子から腫瘍抗原ペプチドを得るために、上記遺伝子がコードするアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成した。HLAに結合可能な腫瘍抗原ペプチドには、HLAの各型に応じて、そのアミノ酸配列にモチーフ(規則的配列)があることが知られている。そこで、HLA-A26に結合し得るペプチドについて、既報(J. Exp. Med. 184:735~740, 1996)に記載の方法により、9merまたは10merのペプチドを設計し合成した。遺伝子KE4-17については、該遺伝子と相同性の高い遺伝子がコードするアミノ酸配列に基づいたペプチドも設計し合成した。

次いで、HLA-A2601を発現させたVA13細胞に、上記合成したペプチドをパルスした後、KE4-CTLと共に培養し、KE4-CTLから産生されるIFN- γ を測定し、これを指標としてHLA-A26拘束性にCTLにより認識されるペプチドを選択した。合成したペプチドのうち21個のペプチド(配列表の配列番号1~21)が、KE4-CTLにより認識され、KE4-CTLからのIFN- γ 産生をペプチドの用量依存的に促進した。すなわち、HLA-A26拘束性にCTLにより認識され、該CTLを活性化できる21個の腫瘍抗原ペプチドを得ることができた。

【0021】

また、HLA-A2に結合しうるモチーフ（規則的配列）は、インターネットホームページ（http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/）を用いて検索し、遺伝子SW620-48および遺伝子SW620-121がそれぞれコードするアミノ酸配列について該モチーフに適合するアミノ酸配列を特定した。そして、その結果に基づいて、HLA-A2結合モチーフを持ったそれぞれ異なる9merまたは10merのペプチドを設計して合成した。

次いで、HLA-A0207を発現させたT2細胞に、上記合成したHLA-A2結合モチーフを有するペプチドをパルスした後、OK-CTLと共に培養し、OK-CTLから産生されるIFN- γ を測定し、これを指標としてHLA-A2拘束性にCTLにより認識されるペプチドを選択した。合成したペプチドのうち18個のペプチド（配列表の配列番号22～39）が、OK-CTLにより認識され、OK-CTLからのIFN- γ 産生をペプチドの用量依存的に促進した。すなわち、HLA-A2拘束性にCTLにより認識され、該CTLを活性化できる18個の腫瘍抗原ペプチドを得ることができた。

【0022】

（ポリペプチドおよびペプチド）

本明細書において、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち長鎖ペプチドをポリペプチドという。例えばタンパク質も本明細書においてはポリペプチドに含まれる。また、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを、単にペプチドという。また、アミノ酸配列を表記する場合、1文字にて表記する場合と3文字にて表記する場合がある。

【0023】

本発明に係るポリペプチドは、ヒト食道癌細胞株KE4またはヒト大腸癌細胞株SW620から得られた上記遺伝子がコードするポリペプチドである。好ましくは配列表の配列番号40～44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。これらのポリペプチドは、CTLを誘導および／または活性

化する腫瘍抗原として使用できる。例えば、配列表の配列番号 40～42 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、HLA-A26 拘束性の抗原特異的な CTL に認識されるため、該 CTL を誘導および／または活性化する腫瘍抗原として使用できる。また、配列表の配列番号 43 若しくは 44 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、HLA-A2 拘束性の抗原特異的な CTL に認識されるため、該 CTL を誘導および／または活性化する腫瘍抗原として使用できる。さらに、これらのポリペプチドは、腫瘍抗原エピトープを特定して腫瘍抗原ペプチドを得るための材料として使用できる。

【0024】

本発明に係る腫瘍抗原ペプチドは、上記ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計されたペプチドから、CTL により認識されるおよび／または CTL を誘導するものを選択することにより得られる。該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-A26 または HLA-A2 と結合して抗原提示細胞表面上に提示され、かつ CTL により認識される腫瘍抗原エピトープとしての性質を有するものであればよく、少なくとも 5 個以上、好ましくは 7 個以上、さらに好ましくは 9 個ないし 10 個のアミノ酸残基からなるペプチドである。好ましくは配列表の配列番号 1～39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。さらに好ましくは配列表の配列番号 2、配列番号 6、配列番号 10、配列番号 15、配列番号 16、および配列番号 20 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。これらのペプチドは CTL を誘導および／または活性化する腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。例えば、配列表の配列番号 1～21 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドは、HLA-A26 拘束性に抗原特異的な CTL により認識され、該 CTL を誘導および／または活性化する腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。また、配列表の配列番号 22～39 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドは、HLA-A2 拘束性に抗原特異的な CTL により認識され、該 CTL を誘導および／または活性化する腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。

【0025】

上記ポリペプチドまたは上記ペプチドは、CTL を誘導および／または活性化

するために、単独で使用してもよいし、2つ以上を組み合わせ使用してもよい。CTLは種々の抗原を認識する複数の細胞からなる細胞集団であることから、好ましくは、これらを2つ以上組み合わせ用いることが推奨される。

【0026】

また、このように特定されたポリペプチドまたはペプチドに基づいて、少なくともHLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性のCTLによる認識を指標として、1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、および／または挿入等の変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドを得ることができる。欠失、置換、付加、および／または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術 (Science 219:666, 1983) を利用することができる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質 (物性、活性、または免疫学的活性等) を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸 (極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等) の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これらのペプチドは、その構成アミノ基若しくはカルボキシル基等を修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0027】

(ポリヌクレオチド)

本発明に係るポリヌクレオチドは、ヒト食道癌細胞株KE4またはヒト大腸癌細胞株SW620より得られた上記遺伝子であり、好ましくは配列表の配列番号45～49のいずれか1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。また、該ポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1～39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号40～44のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをそれぞれコードするものおよびその相補鎖であってもよい。さらに、上記ポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチドのアミノ酸配列中で腫瘍抗原エピトープをコードする領域に対応する少なくとも約15個以上、好ましくは約21～30個以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドおよびその相補鎖であってもよい。この有用なポリヌクレオ

チドの選択および塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して、発現させたペプチドのCTLによる認識および／またはCTL誘導能の確認を行うことにより可能である。

【0028】

さらに、上記ポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも本発明の範囲に包含される。ポリヌクレオチド分子としてDNA分子を代表例にとると、「DNA分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA分子」は、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年)等に記載の方法によって得られる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$ 、0.5% SDSおよび50%ホルムアミドの溶液中で42℃にて加温した後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、0.5% SDSの溶液中で68℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

【0029】

上記ポリヌクレオチドは、HLA-A26またはHLA-A2を有する細胞で発現させたときに、HLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性の抗原特異的なCTLを誘導することおよび／または該CTLにより認識されることができる。例えば、配列表の配列番号45～47のいずれか1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、HLA-A26を有する細胞で発現させたときに、HLA-A26拘束性拘束性の抗原特異的なCTLを誘導することおよび／または該CTLにより認識されることができる。また、配列表の配列番号48若しくは49に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、HLA-A2を有する細胞で発現させたときに、HLA-A2拘束性拘束性の抗原特異的なCTLを誘導することおよび／または該CTLにより認識されることができる。これらのポリヌクレオチドは、その3'末端にポリ(A)構造を有しているが、ポリ(A)の数は腫瘍抗原として作用するアミノ酸のコード部位に影響するものではなく、該ポリヌクレオチドの有するポリ(A)の数は特に限定されない。

【0030】

上記ポリヌクレオチドは、いずれも本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸としての試薬・標準品としても利用できる。

【0031】

(組換えベクター)

上記ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組み込むことにより、組換えベクターが得られる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクター等を用いることができる。

【0032】

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等、とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製される。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所

望の組換えベクターが得られる。

【0033】

(形質転換体)

上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクターDNAにより、自体公知の宿主、例えば大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、または動物細胞等を自体公知の方法で形質転換することにより形質転換体を得られる。形質転換を行う場合、より好ましい系としては遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年)等に記載されている標準的な方法により行うことができる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ負荷 (scrape loading)、バリスティック導入 (ballistic introduction) および感染等が挙げられる。

【0034】

また、形質転換体に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを提供可能である。上記ポリヌクレオチドが組み込まれた発現ベクターDNAを導入した形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、形質転換体により発現される本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの作用、特に少なくともCTLを誘導および／または活性化する作用あるいは宿主中または宿主外に産生された該ポリペプチドまたはペプチド量を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

【0035】

(化学合成)

本発明に係るペプチドは、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造

できる。例えば、ペプチド合成（丸善）1975年、“Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1996”が例示されるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

【0036】

（ポリペプチドまたはペプチドの回収）

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの回収は、該ポリペプチドまたは該ペプチドのCTLによる認識を指標にして、例えば該CTLからのIFN- γ 産生を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせるか、溶解度差に基づく硫安、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、これらのアミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作製し、得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【0037】

（抗体）

本発明に係る抗体は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は上記ポリペプチド若しくは上記ペプチド自体でもまたはその断片でもよく、少なくとも5個、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸で構成される。上記ポリペプチドまたは上記ペプチドに特異的な抗体を作製するためには、該ポリペプチドまたは該ペプチドに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも該ポリペプチドまたは該ペプチドのアミノ酸配列と相同である必要はなく、該ポリペプチドまたは該ペプチドの立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に該ポリペプチドまたは該ペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

【0038】

抗体を産生するためには、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で

単独または担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

【0039】

ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

【0040】

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3-X63-Ag8株等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

【0041】

かくして得られた、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを認識し結合し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該ポリペプチドまたは該ペプチドの精製用抗体、試薬、または標識マーカ等として利用できる。

【0042】

(スクリーニング)

本発明に係るポリペプチド若しくはペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組み合わせることによって、CTLによる該ポリペプチド若しくは該ペプチドの認識を増強し得る物質のスクリーニングに有効な手段を提供する。スクリーニング方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築

可能である。例えば、実施例に示したように、腫瘍抗原ペプチドをパルスした抗原提示細胞によるCTLの誘導および／または該抗原提示細胞のCTLによる認識を、CTLのIFN- γ 産生量を指標として測定する実験系を用いて、ここに被検物質を加えることにより、CTLによる本発明に係るポリペプチド若しくはペプチドの認識を増強する物質を選別できる。この実験系はスクリーニング方法の1つを説明するものであり、本発明に係るスクリーニング方法はこれに限定されるものではない。

【0043】

本発明は、上記スクリーニング方法によって得られた化合物も対象とする。該化合物は、本発明に係るペプチド若しくはポリペプチド、例えば配列表の配列番号1～21のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号40～42のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、および／またはHLA-A26と相互作用してHLA-A26拘束性CTLによる該ポリペプチド若しくは該ペプチドの認識を増強する化合物であり得る。また、本発明に係るポリペプチド若しくはペプチド、例えば配列表の配列番号22～39のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド若しくは配列表の配列番号43若しくは44に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、および／またはHLA-A2と相互作用してHLA-A2拘束性CTLによる該ポリペプチド若しくは該ペプチドの認識を増強する化合物であり得る。また、本発明に係るポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物等も本発明の範囲に包含される。かくして選別された化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。

【0044】

(医薬組成物)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドとして、HLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性に抗原特異的なCTLを誘導および／または活性化するために使用できる。すなわち、上記ポリペプチドまたはペプチドを使用することを特徴とするCTLの誘導方法並びに上記ポリペプチドまたはペプチドを含有するCTLの誘導剤も、本発明の範囲に包含さ

れる。

【0045】

また、本発明に係るポリペプチド若しくはペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき作製した組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換させた細胞、該ポリペプチド若しくはペプチドを免疫学的に認識する抗体、該ポリペプチド若しくは該ペプチドおよび／またはHLA-A26と相互作用してCTLによる該ポリペプチド若しくは該ペプチドの認識を増強する化合物、該ポリペプチド若しくは該ペプチドおよび／またはHLA-A2と相互作用してCTLによる該ポリペプチド若しくは該ペプチドの認識を増強する化合物、または該ポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物を、単独または複数組み合わせることで利用することにより、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供できる。例えば、該医薬組成物は癌の治療、例えば食道癌または大腸癌の治療において有用である。HLA-A26対立遺伝子は日本人の約11%においてみられ、HLA-A2対立遺伝子は、日本人の約40%、中国人の約53%、北アメリカコーカサス人の約49%、南アメリカコーカサス人の約38%、アフリカ黒人の約23%においてみられることから、本発明に係る医薬組成物は、多数の患者においてその効果を期待できる。

【0046】

具体的には、例えば本発明に係るポリペプチドまたはペプチドからなる医薬、さらに本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを含有する医薬組成物は、いわゆる癌ワクチンとして使用できる。このとき、細胞性免疫の活性化のために、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは適当なアジュバントの存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いる。担体は、それ自体が人体に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。剤形は、自体公知のポリペプチドまたはペプチドを製剤化する手段を応用して適宜選択できる。その投与量は、CTLによる当該ペプチドの認識の程度により変化するが、一般的には活性本体として0.01mg～100mg/日/成人ヒト、好ましくは0.1mg～10mg/日/

成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

【0047】

または、患者の末梢血より単核細胞画分を採取し、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドと共に培養し、CTLが誘導および／または活性化された該単核細胞画分を患者の血液中に戻すことによって、有効な癌ワクチン効果を得られる。培養するときの単核細胞濃度、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの濃度等の培養条件は、簡単な実験により決定できる。また、培養時、インターロイキン2等のリンパ球増殖能を有する物質を添加してもよい。

【0048】

癌ワクチンとして本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを使用する場合、1つのポリペプチドまたはペプチドのみでも癌ワクチンとして有効であるが、複数の種類の上記ポリペプチドまたはペプチドを組み合わせることもできる。癌患者のCTLは複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であるため、1種類のポリペプチドまたはペプチドを癌ワクチンとして使用するより複数を組み合わせる癌ワクチンとして使用する方が、より高い効果が得られるときがある。特に、HLA-A26とHLA-A2の両方の型のHLAを有する癌患者においては、HLA-A26拘束性CTLに認識されるポリペプチドまたはペプチドと、HLA-A2拘束性CTLに認識されるポリペプチドまたはペプチドとを組み合わせる癌ワクチンとして使用すると、高い効果が得られるときがある。。

【0049】

本発明に係るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、癌、例えば食道癌または大腸癌の遺伝子治療のために有用である。これらポリヌクレオチドをベクターに担持させ、直接体内に導入する方法またはヒトから細胞を採取したのち体外で導入する方法があるが、いずれも利用できる。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性である。その投与量は、CTLによる該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの認識の程度により変化するが、一般的には本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードするDNA含量として0.1 μ g～100mg/日/成人ヒト、好ましくは1 μ

g ~ 50 mg / 日 / 成人ヒトである。これを数日ないし数月に 1 回投与する。

【0050】

(診断のための測定方法および試薬)

本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、並びに該ポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用可能である。また本発明は、これらのうちの 1 種またはそれ以上を充填した、1 個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチドまたはポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0051】

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの発現または活性に関連した疾患の診断手段は、例えば当該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドとの相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在量を決定すること、および／または当該ポリペプチドまたはペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ポリペプチドまたはペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。すなわち、本発明に係るポリペプチド若しくはペプチドまたはこれらをコードしている核酸を診断マーカーとして定性的にあるいは定量的に測定する。試料中の当該ポリペプチド若しくはペプチドまたはこれらをコードしている核酸の定量的または定性的な測定法は当業者に周知の方法を利用することができる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析および ELISA アッセイ等がある。また、核酸は、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロッティングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて RNA レベルでの検出および定量することができる。

【0052】

測定される試料として、個体由来の細胞、例えば血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等が挙げられる。また、測定される核酸は、上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノム DNA を検出に直接使用

してもよく、あるいは分析前にPCR若しくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを標識した上記ポリペプチドをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。

【0053】

上記測定により本発明に係るポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAの変異、減少、増加を検出することにより、当該ポリペプチドが関連する疾患、例えば、上皮性の癌や腺癌等の診断が可能となる。

【0054】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

(細胞傷害性T細胞株の樹立)

まず、腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球株(CTL)を、食道癌患者(HLA-A2601/2402)の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)から、文献に記載の方法に準じて樹立した(Int. J. Cancer 81:459~466, 1999)。まず、食道癌患者から得たTILを100U/mlの組換えヒトIL-2を添加して50日以上長期培養した。培養7日毎に該培養したTILの一部を採取し、種々の腫瘍細胞または正常細胞と共に培養して、IFN- γ 産生の測定および腫瘍細胞からの⁵¹Cr遊離実験を行った(J. Immunol. 163, 4997~5004, 1999)。IFN- γ の測定は、酵素免疫固相法(ELISA)により行った。その結果、HLA-A26拘束性に腫瘍特異的細胞傷害活性を示す細胞株KE4-CTLが得られた。

また、大腸癌患者(HLA-A0207/3101)のTILから、上記同様の方法で、HLA-A2拘束性に腫瘍特異的細胞傷害活性を示す細胞株OK-CTLを得た(J. Immunol. 163:4997~5004, 1999)。

上記樹立したそれぞれの細胞傷害性T細胞株は、それぞれ少量ずつ分別して凍

結し、使用直前まで保存した。

【0055】

【実施例 2】

(HLA-A26 拘束性腫瘍抗原をコードする cDNA クローンの単離・同定)

実施例 1 で得た KE4-CTL によって認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子を、ヒト食道癌細胞株 KE4 から、既知の方法 (J. Exp. Med. 187 : 277~288, 1998) に準拠して単離・同定した。まず、KE4 腫瘍細胞の poly (A) + RNA を cDNA に転換して Sal I アダプターにライゲーションし、発現ベクター pCMV-SPORT-2 (Invitrogen 社製) に挿入した。また、HLA-A2601 の cDNA を、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって得、真核細胞発現ベクター pCR3 (Invitrogen 社製) にクローン化した。

【0056】

KE4 細胞 cDNA ライブラリーは 100 クローンずつプールし、各ウエル毎にプールした cDNA 200 ng と HLA-A2601 cDNA 200 ng とを、100 μ l の lipofectamine (Invitrogen 社製) / Opti-MEM (Invitrogen 社製) 1:200 混液中で 30 分間混合した。この混合物の 50 μ l を VA13 細胞 (1×10^4) に加え、6 時間インキュベーションして共遺伝子導入した。次いで 10% FCS を含む RPMI-1640 培地を加えて 2 日間培養し、KE4-CTL (2×10^5 細胞) を各ウエルに添加した。18 時間インキュベーションした後、上清の 100 μ l を採り、産生された IFN- γ を ELISA 法により測定し、cDNA ライブラリーのプールをスクリーニングした。

【0057】

その結果、CTL からの IFN- γ 産生を促進した上記 KE4 腫瘍細胞 cDNA プールについて再現性を確認し、次いで当該再現性が確認された cDNA プールから個別にクローンを取りだし、上記同様にスクリーニングを行って、CTL に認識される独立プール由来のクローンを選別した。さらに、得られたクローンの用量依存性を上記同様の方法で確認し、最終的に、KE4-cl. 17、KE

4-c1.18、およびKE4-c1.21の3個のcDNAクローンを得た。これらのcDNAクローンは、HLA-A26拘束性かつ用量依存的にKE4-CTLにより認識され、KE4-CTLのIFN- γ 産生を促進した(図1)。一方、発現ベクターpCMV-SPORT-2のみをHLA-A2601とともに共遺伝子導入したVA13細胞を用いたときには、KE4-CTLからのIFN- γ 産生は観察されなかった。

【0058】

得られたcDNAクローンの塩基配列の決定は、DNAシーケンシングキット(Perkin-Elmer社製)を用い、ABI PRISMTM377DNA Sequencer(Perkin-Elmer社製)を使用して、ダイデオキシヌクレオチドシーケンシング法により行った。さらに、各cDNAクローンがコードするアミノ酸配列をそれぞれの塩基配列から推定した。また、得られた各クローンの塩基配列について、GenBankに対して相同性検索を行った。その結果を上記表1に示した。

【0059】

【実施例3】

(HLA-A2腫瘍抗原をコードするcDNAクローンの単離・同定)

実施例1で得たOK-CTLによって認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子を、ヒト大腸癌細胞株SW620から単離・同定した。単離・同定の方法は、HLA-A2601の代わりにHLA-A0207を使用し、VA13細胞の代わりにCOS7細胞を使用すること以外は実施例2と同様の方法を用いた。

【0060】

その結果、SW620-c1.48およびSW620-c1.121の2個のcDNAクローンを得た。図2の(A)および(B)に示すように、これらのcDNAクローンは、それぞれHLA-A2拘束性かつ用量依存的にOK-CTLにより認識され、OK-CTLのIFN- γ 産生を促進した。一方、発現ベクターpCMV-SPORT-2のみをHLA-A0207とともに共遺伝子導入したCOS-7細胞を用いたときには、OK-CTLからのIFN- γ 産生は観察されなかった。

【0061】

得られた cDNA クローンの塩基配列の決定は、実施例 2 と同様の方法で行い、各 cDNA クローンがコードするアミノ酸配列をそれぞれの塩基配列から推定した。また、得られた各クローンの塩基配列について、GenBank に対して相同性検索を行った。その結果を上記表 2 に示した。

【0062】

【実施例 4】

(HLA-A26 拘束性腫瘍抗原ペプチドの同定)

腫瘍抗原をコードする遺伝子 KE4-17、遺伝子 KE4-18、および遺伝子 KE4-21 から腫瘍抗原ペプチドを得るために、当該各遺伝子がコードするアミノ酸配列に基づき、既報 (J. Exp. Med. 184:735~740, 1996) に記載の方法で、それぞれ異なる複数個の 9mer または 10mer のペプチドを設計して合成し、70%以上の純度を有するペプチドを得た。遺伝子 KE4-17 については、該遺伝子と相同性の高い遺伝子がコードするアミノ酸配列に基づいたペプチドも設計し合成した。

【0063】

(ペプチドの CTL 活性化試験)

HLA-A2601 を発現させた VA13 細胞に上記合成したペプチドをパルスした後、実施例 1 で得た KE4-CTL と共に培養し、KE4-CTL から産生される IFN- γ を測定し、これを指標として HLA-A26 拘束性に CTL に認識されるペプチドを選択した。まず、VA13 細胞に、HLA-A2601 プラスミドを 100 ng/ウェル加え、2 日間培養して遺伝子導入した後に、上記合成された各ペプチド (1.22 ng/ml ~ 20 μ g/ml) とともに 26℃ で 3 時間インキュベーションし、次いで、5% CO₂-95% Air で 37℃ 3 時間インキュベーションし、細胞表面上に発現している HLA-A26 にペプチドを結合させた。該ペプチドをパルスした VA13 細胞を標的細胞 (T) として用い、KE4-CTL をエフェクター細胞 (E) として用いた。標的細胞 1 × 10⁴ 個とエフェクター細胞 2 × 10⁴ とを混合し (E/T 比 = 2)、18 時間インキュベーションした。インキュベーション後の上清 100 μ l を回収して E

LISAによりIFN- γ を測定した。この時、ペプチドをパルスしていないVA13細胞に対するCTLのIFN- γ 産生をバックグラウンドとして、各測定値から減算した。この検討は各ペプチドについて2回ずつ行った。2回の実験それぞれにおいて、KE4-CTLは凍結保存しておいたものを融解後にフィーダー細胞を用いて培養してから使用した。すなわち、2回の実験で使用したKE4-CTLのロットは異なる。

【0064】

その結果、配列表の配列番号1～21に記載した21個のペプチドがKE4-CTLにより認識され、該KE4-CTLからのIFN- γ 産生を促進した。得られた21個のペプチドは、KE4-17由来のKE4-17・P12およびKE4-17・P19（配列表の配列番号6および7）、KE4-17と相同性の高い遺伝子由来のKE4-17・P1、KE4-17・P3、KE4-17・P5、KE4-17・P7、およびKE4-17・P11（配列表の配列番号1～5）、KE4-18由来のKE4-18・P5、KE4-18・P9、KE4-18・P15、KE4-18・P16、KE4-18・P22、KE4-18・P25、KE4-18・P26、およびKE4-18・P27（配列表の配列番号8～15）、並びにKE4-21由来のKE4-21・P28、KE4-21・P29、KE4-21・P38、KE4-21・P39、KE4-21・P40、およびKE4-21・P47（配列表の配列番号16～21）である。このうち、KE4-17・P3（配列表の配列番号2）、KE4-17・P12（配列表の配列番号6）、KE4-18・P15（配列表の配列番号10）、KE4-18・P27（配列表の配列番号15）、KE4-21・P28（配列表の配列番号16）、およびKE4-21・P40（配列表の配列番号20）は、2回行った両方の実験において、KE4-CTLにより認識され、該KE4-CTLからのIFN- γ 産生を促進した。残り15個のペプチドは、2回行った実験のうち一方でのみKE4-CTLにより認識されて該KE4-CTLからのIFN- γ 産生を促進した。2回の実験において結果が異なるのは、CTLが様々な抗原に反応するCTLの集団であることから、例えば上記のように凍結状態から融解した後の培養時に使用するフィーダー細胞が異なった場合、ペプチドに対する

反応性が異なるCTLが得られることが十分有り得るためであると推察される。

代表例としてKE4-21由来のペプチドによるKE4-CTLからのペプチド用量依存的なIFN- γ 産生を、図3に示した。図3の(A)および(B)は、2回行った実験の結果をそれぞれ示す。

【0065】

【実施例5】

(HLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドの同定)

腫瘍抗原をコードする遺伝子SW620-48および遺伝子SW620-121から腫瘍抗原ペプチドを得るために、まずHLA-A2に結合しうるモチーフ(規則的配列)の検索を、当該各遺伝子がコードするアミノ酸配列についてコンピューターにより行った(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)。その結果に基づいて、それぞれ異なる9merまたは10merのペプチドを設計して自体公知の方法で合成し、70%以上の純度を有するペプチドを得た。

【0066】

(ペプチドのCTL活性化試験)

上記合成した各ペプチド(1.22ng/ml~20 μ g/ml)を、HLA-A2分子がペプチドと結合しない形で細胞表面に発現しているT2細胞(Cancer Res. 54, 1071~1076, 1994)と、26℃で3時間インキュベーションし、次いで、5%CO₂/95%Airで37℃3時間インキュベーションして、細胞表面上に発現しているHLA-A2に当該各ペプチドを結合させた。該ペプチドをパルスしたT2細胞を標的細胞(T)として用いた。また、実施例2で得たOK-CTLをエフェクター細胞(E)として用いた。標的細胞 1×10^4 個とエフェクター細胞 2×10^4 とを混合し(E/T比=2)、18時間インキュベーションした。インキュベーション後の上清100 μ lを回収してELISAによりIFN- γ を測定した。この時、ペプチドをパルスしていないT2細胞に対するCTLのIFN- γ 産生をバックグラウンドとして、各測定値から減算した。その結果、配列表の配列番号22~39に記載した18個のペプチドが用量依存的にOK-CTLにより認識され、OK-CTLからの

IFN- γ 産生を促進した。一方、ネガティブコントロールとして該ペプチドのかわりに HIV (Human Immunodeficiency Virus) 由来のペプチド (SLYNTVATL) を用いたときは、CTL による IFN- γ 産生は促進されなかった。得られた 18 個のペプチドは、SW620-48 由来の SW620-48-P162、SW620-48-P163、SW620-48-P165、SW620-48-P166、SW620-48-P173、および SW620-48-P174 (配列表の配列番号 22~27)、並びに SW620-121 由来の SW620-121-P665、SW620-121-P666、SW620-121-P667、SW620-121-P668、SW620-121-P669、SW620-121-P676、SW620-121-P677、SW620-121-P678、SW620-121-P679、SW620-121-P685、SW620-121-P683、および SW620-121-P688 (配列表の配列番号 28~39) である。代表例として SW620-48 由来の 6 個のペプチドが用量依存的に OK-CTL に認識されて、該 OK-CTL による IFN- γ 産生を促進した結果を図 4 に示した。

【0067】

【発明の効果】

本発明により、HLA-A26 拘束性または HLA-A2 拘束性の細胞傷害性 T 細胞を誘導および／または活性化せしめることができ、上皮性癌および腺癌等の、例えば食道癌または大腸癌等の特異的免疫療法が可能となる。HLA-A26 対立遺伝子は日本人の約 11% においてみられ、HLA-A2 対立遺伝子は、日本人の約 40%、中国人の約 53%、北アメリカコーカサス人の約 49%、南アメリカコーカサス人の約 38%、アフリカ黒人の約 23% においてみられる。従って、本発明は、癌治療において多大な貢献を期待しうる。また、本発明は、上皮性癌および腺癌等の、T 細胞による認識に関する分子の基礎的研究にも多大に寄与するものである。

【0068】

【配列表フリーテキスト】

配列表の配列番号 1 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 2 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 3 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 4 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 5 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 6 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 7 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 8 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 9 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 10 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 11 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 12 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 13 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 14 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 15 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識され

る設計されたペプチド。

配列表の配列番号 16 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 17 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 18 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 19 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 20 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 21 : H L A - A 2 6 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 22 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 23 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 24 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 25 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 26 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 27 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 28 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 29 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 30 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 31 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 32 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 33 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 34 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 35 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 36 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 37 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 38 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

配列表の配列番号 39 : H L A - A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識される設計されたペプチド。

【 0 0 6 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo

<120> Tumor antigen

<130> NP01-1083

<140>

<141>

<160> 49

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 1

Leu Val Leu Asp Gly Arg Gly His Leu

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 2

His Leu Leu Gly Arg Leu Ala Ala Ile

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 3

Ala Ile Val Ala Lys Gln Val Leu Leu

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 4

Val Leu Leu Gly Arg Lys Val Val Val

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 5

Ala Phe Leu Arg Lys Arg Met Asn Thr

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 6

His Phe Arg Ala Pro Ser Arg Ile Phe

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted

cytotoxic T lymphocytes

<400> 7

Val Leu Lys Thr His Gly Leu Leu Val

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 8

Pro Val Thr Lys Leu Gly Arg Leu Val

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 9

Lys Ile Met Pro Val Gln Lys Gln Thr

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 10

Val Thr Gly Arg Cys Gly Ser Val Leu

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 11

Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Thr

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 12

Asp Leu Trp Lys Glu Thr Val Phe Thr

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 13

His Leu Val Lys Thr His Thr Arg Val

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 14

His Thr Arg Val Ser Val Gln Arg Thr

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 15

Arg Thr Gln Ala Pro Ala Val Ala Thr

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 16

Thr Leu Tyr Glu Ala Val Arg Glu Val

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 17

Glu Thr Val Glu Leu Gln Ile Ser Leu

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 18

Lys Val Asp Glu Val Lys Ser Thr Ile

1

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 19

Thr Ile Lys Phe Gln Met Lys Val Leu

1

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 20

Lys Val Leu Cys Leu Ala Val Ala Val

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A26 restricted
cytotoxic T lymphocytes

<400> 21

Ser Thr Met Gly Lys Pro Gln Arg Leu

1

5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 22

Gly Leu Cys Lys Phe Gly Phe Tyr Glu Val

1

5

10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 23

Phe Gly Phe Tyr Glu Val Phe Lys Val

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 24

Leu Gln Trp Phe Ile Tyr Asp Ser Val

1

5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 25

Ala Leu Ala Pro Met Glu Ala Ala Lys Val

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 26

Arg Thr Val Glu Ala Leu Tyr Lys Phe Val

1 5 10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 27

Val Leu Ser Cys Gly Leu Thr His Thr

1

5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 28

Ala Leu Leu Phe Ser Ser Cys Phe Val

1

5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 29

Phe Leu Ser Arg Val Pro Gln Ala Phe Leu

1

5

10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 30

Met Leu Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ser Val

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 31

Leu Leu Gln Asp Asn Leu Pro Lys Ser Val

1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 32

Leu Met Ser Arg His Asn Ile Tyr Val

1

5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 33

Ser Leu Ile Asp Thr Val Arg Ser Tyr Ala

1

5

10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 34

Phe Leu Gln Lys Ala Gly Lys Ser Leu Leu

1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 35

Leu Leu Phe Ser Ser Cys Phe Val Ala

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic

T lymphocytes

<400> 36

Gly Leu Leu Lys Asn Phe Gln Asp Ile

1

5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 37

Ser Val Trp Cys Ser Asn Asp Tyr Leu

1

5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 38

Leu Leu Val Thr Trp Lys Gln Val Gly Leu

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

peptide recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic
T lymphocytes

<400> 39

Val Ala Asn Asp Ser Thr Leu Phe Thr Leu

1 5 10

<210> 40

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Asn Thr Asn Pro Ser Arg Gly Pro Tyr His Phe Arg Ala Pro Ser
1 5 10 15

Arg Ile Phe Trp Arg Thr Val Arg Gly Met Leu Pro His Lys Thr Lys
20 25 30

Arg Gly Gln Ala Ala Leu Asp Arg Leu Lys Val Phe Asp Gly Ile Pro
35 40 45

Pro Pro Tyr Asp Lys Lys Lys Arg Met Val Val Pro Ala Ala Leu Lys
50 55 60

Val Val Arg Leu Lys Pro Thr Arg Lys Phe Ala Tyr Leu Gly Arg Leu
65 70 75 80

Ala His Glu Val Gly Trp Lys Tyr Gln Ala Val Thr Ala Thr Leu Glu
85 90 95

Glu Lys Arg Lys Glu Lys Ala Lys Ile His Tyr Arg Lys Lys Lys Gln
100 105 110

Leu Met Arg Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Asn Val Glu Lys Lys Ile
115 120 125

Asp Lys Tyr Thr Glu Val Leu Lys Thr His Gly Leu Leu Val
130 135 140

<210> 41

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Pro Val Thr Lys Leu Gly Arg Leu Val Lys Asp Met Lys Ile Lys

1 5 10 15

Ser Leu Glu Glu Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Pro Ile Lys Glu Ser Glu

20 25 30

Ile Ile Asp Phe Phe Leu Gly Ala Ser Leu Lys Asp Glu Val Leu Lys

35 40 45

Ile Met Pro Val Gln Lys Gln Thr Arg Ala Gly Gln Arg Thr Arg Phe

50 55 60

Lys Ala Phe Val Ala Ile Gly Asp Tyr Asn Gly His Val Gly Leu Gly

65 70 75 80

Val Lys Cys Ser Lys Glu Val Ala Thr Ala Ile Arg Gly Ala Ile Ile

85 90 95

Leu Ala Lys Leu Ser Ile Val Pro Val Arg Arg Gly Tyr Trp Gly Asn

100 105 110

Lys Ile Gly Lys Pro His Thr Val Pro Cys Lys Val Thr Gly Arg Cys

115 120 125

Gly Ser Val Leu Val Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Thr Gly Ile
130 135 140

Val Ser Ala Pro Val Pro Lys Lys Leu Leu Met Met Ala Gly Ile Asp
145 150 155 160

Asp Cys Tyr Thr Ser Ala Arg Gly Cys Thr Ala Thr Leu Gly Asn Phe
165 170 175

Ala Lys Ala Thr Phe Asp Ala Ile Ser Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Thr
180 185 190

Pro Asp Leu Trp Lys Glu Thr Val Phe Thr Lys Ser Pro Tyr Gln Glu
195 200 205

Phe Thr Asp His Leu Val Lys Thr His Thr Arg Val Ser Val Gln Arg
210 215 220

Thr Gln Ala Pro Ala Val Ala Thr Thr
225 230

<210> 42

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ser Ser Lys Val Ser Arg Asp Thr Leu Tyr Glu Ala Val Arg Glu

1	5	10	15
Val Leu His Gly Asn Gln Arg Lys Arg Arg Lys Phe Leu Glu Thr Val			
20	25	30	
Glu Leu Gln Ile Ser Leu Lys Asn Tyr Asp Pro Gln Lys Asp Lys Arg			
35	40	45	
Phe Ser Gly Thr Val Arg Leu Lys Ser Thr Pro Arg Pro Lys Phe Ser			
50	55	60	
Val Cys Val Leu Gly Asp Gln Gln His Cys Asp Glu Ala Lys Ala Val			
65	70	75	80
Asp Ile Pro His Met Asp Ile Glu Ala Leu Lys Lys Leu Asn Lys Asn			
85	90	95	
Lys Lys Leu Val Lys Lys Leu Ala Lys Lys Tyr Asp Ala Phe Leu Ala			
100	105	110	
Ser Glu Ser Leu Ile Lys Gln Ile Pro Arg Ile Leu Gly Pro Gly Leu			
115	120	125	
Asn Lys Ala Gly Lys Phe Pro Ser Leu Leu Thr His Asn Glu Asn Met			
130	135	140	
Val Ala Lys Val Asp Glu Val Lys Ser Thr Ile Lys Phe Gln Met Lys			
145	150	155	160

Lys Val Leu Cys Leu Ala Val Ala Val Gly His Val Lys Met Thr Asp
165 170 175

Asp Glu Leu Val Tyr Asn Ile His Leu Ala Val Asn Phe Leu Val Ser
180 185 190

Leu Leu Lys Lys Asn Trp Gln Asn Val Arg Ala Leu Tyr Ile Lys Ser
195 200 205

Pro Met Gly Lys Pro Gln Arg Leu Tyr
210 215

<210> 43

<211> 361

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Phe Ser Ser Val Ala His Leu Ala Arg Ala Asn Pro Phe Asn Thr
1 5 10 15

Pro His Leu Gln Leu Val His Asp Gly Leu Gly Asp Leu Arg Ser Ser
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Thr Gly Gln Pro Arg Arg Pro Arg Asn Leu Ala Ala
35 40 45

Ala Ala Val Glu Glu Tyr Ser Cys Glu Phe Gly Ser Ala Lys Tyr Tyr

50 55 60

Ala Leu Cys Gly Phe Gly Gly Val Leu Ser Cys Gly Leu Thr His Thr
65 70 75 80

Ala Val Val Pro Leu Asp Leu Val Lys Cys Arg Met Gln Val Asp Pro
85 90 95

Gln Lys Tyr Lys Gly Ile Phe Asn Gly Phe Ser Val Thr Leu Lys Glu
100 105 110

Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Lys Gly Trp Ala Pro Thr Phe Leu Gly
115 120 125

Tyr Ser Met Gln Gly Leu Cys Lys Phe Gly Phe Tyr Glu Val Phe Lys
130 135 140

Val Leu Tyr Ser Asn Met Leu Gly Glu Glu Asn Thr Tyr Leu Trp Arg
145 150 155 160

Thr Ser Leu Tyr Leu Ala Ala Ser Ala Ser Ala Glu Phe Phe Ala Asp
165 170 175

Ile Ala Leu Ala Pro Met Glu Ala Ala Lys Val Arg Ile Gln Thr Gln
180 185 190

Pro Gly Tyr Ala Asn Thr Leu Arg Asp Ala Ala Pro Lys Met Tyr Lys
195 200 205

Glu Glu Gly Leu Lys Ala Phe Tyr Lys Gly Val Ala Pro Leu Trp Met
210 215 220

Arg Gln Ile Pro Tyr Thr Met Met Lys Phe Ala Cys Phe Glu Arg Thr
225 230 235 240

Val Glu Ala Leu Tyr Lys Phe Val Val Pro Lys Pro Arg Ser Glu Cys
245 250 255

Ser Lys Pro Glu Gln Leu Val Val Thr Phe Val Ala Gly Tyr Ile Ala
260 265 270

Gly Val Phe Cys Ala Ile Val Ser His Pro Ala Asp Ser Val Val Ser
275 280 285

Val Leu Asn Lys Glu Lys Gly Ser Ser Ala Ser Leu Val Leu Lys Arg
290 295 300

Leu Gly Phe Lys Gly Val Trp Lys Gly Leu Phe Ala Arg Ile Ile Met
305 310 315 320

Ile Gly Thr Leu Thr Ala Leu Gln Trp Phe Ile Tyr Asp Ser Val Lys
325 330 335

Val Tyr Phe Arg Leu Pro Arg Pro Pro Pro Pro Glu Met Pro Glu Ser
340 345 350

Leu Lys Lys Lys Leu Gly Leu Thr Gln
355 360

<210> 44

<211> 640

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Glu Ser Val Val Arg Arg Cys Pro Phe Leu Ser Arg Val Pro Gln

1 5 10 15

Ala Phe Leu Gln Lys Ala Gly Lys Ser Leu Leu Phe Tyr Ala Gln Asn

20 25 30

Cys Pro Lys Met Met Glu Val Gly Ala Lys Pro Ala Pro Arg Ala Leu

35 40 45

Ser Thr Ala Ala Val His Tyr Gln Gln Ile Lys Glu Thr Pro Pro Ala

50 55 60

Ser Glu Lys Asp Lys Thr Ala Lys Ala Lys Val Gln Gln Thr Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ser Gln Gln Ser Pro Asp Gly Thr Gln Leu Pro Ser Gly His Pro

85 90 95

Leu Pro Ala Thr Ser Gln Gly Thr Ala Ser Lys Cys Pro Phe Leu Ala

100 105 110

Ala Gln Met Asn Gln Arg Gly Ser Ser Val Phe Cys Lys Ala Ser Leu
115 120 125

Glu Leu Gln Glu Asp Val Gln Glu Met Asn Ala Val Arg Lys Glu Val
130 135 140

Ala Glu Thr Ser Ala Gly Pro Ser Val Val Ser Val Lys Thr Asp Gly
145 150 155 160

Gly Asp Pro Ser Gly Leu Leu Lys Asn Phe Gln Asp Ile Met Gln Lys
165 170 175

Gln Arg Pro Glu Arg Val Ser His Leu Leu Gln Asp Asn Leu Pro Lys
180 185 190

Ser Val Ser Thr Phe Gln Tyr Asp Arg Phe Phe Glu Lys Lys Ile Asp
195 200 205

Glu Lys Lys Asn Asp His Thr Tyr Arg Val Phe Lys Thr Val Asn Arg
210 215 220

Arg Ala His Ile Phe Pro Met Ala Asp Asp Tyr Ser Asp Ser Leu Ile
225 230 235 240

Thr Lys Lys Gln Val Ser Val Trp Cys Ser Asn Asp Tyr Leu Gly Met
245 250 255

Ser Arg His Pro Arg Val Cys Gly Ala Val Met Asp Thr Leu Lys Gln
260 265 270

His Gly Ala Gly Ala Gly Gly Thr Arg Asn Ile Ser Gly Thr Ser Lys
275 280 285

Phe His Val Asp Leu Glu Arg Glu Leu Ala Asp Leu His Gly Lys Asp
290 295 300

Ala Ala Leu Leu Phe Ser Ser Cys Phe Val Ala Asn Asp Ser Thr Leu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Ala Lys Met Met Pro Gly Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Ser
325 330 335

Gly Asn His Ala Ser Met Ile Gln Gly Ile Arg Asn Ser Arg Val Pro
340 345 350

Lys Tyr Ile Phe Arg His Asn Asp Val Ser His Leu Arg Glu Leu Leu
355 360 365

Gln Arg Ser Asp Pro Ser Val Pro Lys Ile Val Ala Phe Glu Thr Val
370 375 380

His Ser Met Asp Gly Ala Val Cys Pro Leu Glu Glu Leu Cys Asp Val
385 390 395 400

Ala His Glu Phe Gly Ala Ile Thr Phe Val Asp Glu Val His Ala Val
405 410 415

Gly Leu Tyr Gly Ala Arg Gly Gly Gly Ile Gly Asp Arg Asp Gly Val

420

425

430

Met Pro Lys Met Asp Ile Ile Ser Gly Thr Leu Gly Lys Ala Phe Gly

435

440

445

Cys Val Gly Gly Tyr Ile Ala Ser Thr Ser Ser Leu Ile Asp Thr Val

450

455

460

Arg Ser Tyr Ala Ala Gly Phe Ile Phe Thr Thr Ser Leu Pro Pro Met

465

470

475

480

Leu Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ser Val Arg Ile Leu Lys Ser Ala Glu

485

490

495

Gly Arg Val Leu Arg Arg Gln His Gln Arg Asn Val Lys Leu Met Arg

500

505

510

Gln Met Leu Met Asp Ala Gly Leu Pro Val Val His Cys Pro Ser His

515

520

525

Ile Ile Pro Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Lys Asn Thr Glu Val Cys

530

535

540

Asp Glu Leu Met Ser Arg His Asn Ile Tyr Val Gln Ala Ile Asn Tyr

545

550

555

560

Pro Thr Val Pro Arg Gly Glu Glu Leu Leu Arg Ile Ala Pro Thr Pro

565

570

575

His His Thr Pro Gln Met Met Asn Tyr Phe Leu Glu Asn Leu Leu Val
580 585 590

Thr Trp Lys Gln Val Gly Leu Glu Leu Lys Pro His Ser Ser Ala Glu
595 600 605

Cys Asn Phe Cys Arg Arg Pro Leu His Phe Glu Val Met Ser Glu Arg
610 615 620

Glu Lys Ser Tyr Phe Ser Gly Leu Ser Lys Leu Val Ser Ala Gln Ala
625 630 635 640

<210> 45

<211> 974

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

gaaacaagtt gaagtacctg gctttcctcc gcaagcggat gaacaccaac ctttcccgag 60
gcccctacca cttccgggcc ccagccgca tcttctggcg gaccgtgcga ggtatgctgc 120
cccacaaaac caagcgaggc caggccgctc tggaccgtct caaggtgttt gacggcatcc 180
cacctcccta cgacaagaaa aagcggatgg tggttcctgc tgccctcaag gtcgtgcgctc 240
tgaagcctac aagaaagttt gcctatctgg ggcgcctggc tcacgaggtt ggctggaagt 300
accaggcagt gacagccacc ctggaggaga agaggaaaga gaaagccaag atccactacc 360
ggaagaagaa acagctcatg aggctacgga aacaggccga gaagaacgtg gagaagaaaa 420

ttgacaaata cacagaggtc ctcaagaccc acggactcct ggtctgagcc caataaagac 480
tgttaattcc tcatgcgttg cctgcccttc ctccattggt gccctggaat gtacgggacc 540
caggggcagc agcagtccag gtgccacagg cagccctggg acataggaag ctgggagcaa 600
ggaaagggtc ttagtcaactg cctcccgaag ttgcttgaaa gcactcggag aattgtgcag 660
gtgtcattta tctatgacca ataggaagag caaccagtta ctatgagtga aaggagacca 720
gaagactgat tggaggggccc tatcttgtga gtggggcatc tgttggactt cccacctggt 780
catatactct gcagctgtta gaatgtgcaa gcacttgggg acagcatgag cttgctgttg 840
tacacagggt atttctagaa gcagaaatag actgggaaga tgcacaacca aggggttaca 900
ggcatcgccc atgctcctca cctgtatfff gtaatcagaa ataaattgct tttaaagaaa 960
aaaaaaaaa aaaa 974

<210> 46

<211> 821

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

ggggccgggg ccgaggccgc ggagctcgcg gaggcaaggc cgaggataag gagtggatgc 60
ccgtcaccaa gttgggccc ttggtcaagg acatgaagat caagtccctg gaggagatct 120
atctcttctc cctgcccatt aaggaatcag agatcattga tttcttcctg ggggcctctc 180
tcaaggatga ggttttgaag attatgccag tgcagaagca gaccctgcc ggccagcgca 240
ccaggttcaa ggcatattgt gctatcgggg actacaatgg ccacgtcggc ctgggtgtta 300
agtgtcccaa ggaggtggcc accgccatcc gtggggccat catcctggcc aagctctcca 360
tcgtccccgt gcgcagaggc tactggggga acaagatcgg caagccccac actgtccctt 420
gcaagggtgac aggccgctgc ggctctgtgc tggtacgcct catccctgca cccaggggca 480
ctggcatcgt ctccgcacct gtgcctaaga agctgctcat gatggctggt atcgatgact 540
gctacacctc agcccggggc tgcactgcca ccctgggcaa cttcgccaag gccacctttg 600
atgccatttc taagacctac agctacctga ccccgacct ctggaaggag actgtattca 660

ccaagtctcc ctatcaggag ttactgacc acctcgtcaa gacccacacc agagtctccg 720
tgcagcggac tcaggctcca gctgtggcta caacataggg tttttataca agaaaaataa 780
agtgaattta gcgtgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 821

<210> 47

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

gcggcgtgag aagccatgag cagcaaagtc tctcgcgaca ccctgtacga ggcggtgcgg 60
gaagtctctgc acgggaacca gcgcaagcgc cgcaagttcc tggagacggt ggagttgcag 120
atcagcttga agaactatga tccccagaag gacaagcgct tctcgggcac cgtcaggctt 180
aagtccactc cccgccctaa gttctctgtg tgtgtcctgg gggaccagca gcactgtgac 240
gaggctaagg ccgtggatat cccccacatg gacatcgagg cgctgaaaaa actcaacaag 300
aataaaaaaac tggtaagaa gctggccaag aagtatgatg cgtttttggc ctgagagtct 360
ctgatcaagc agattccacg aatcctcggc ccaggtttaa ataaggcagg aaagttccct 420
tccctgctca cacacaacga aaacatggtg gccaaagtgg atgaggtgaa gtccacaatc 480
aagttccaaa tgaagaaggt gttatgtctg gctgtagctg ttggtcacgt gaagatgaca 540
gacgatgagc ttgtgtataa cattcacctg gctgtcaact tcttgggtgc attgctcaag 600
aaaaactggc agaatgtccg ggccttatat atcaagagcc ccatgggcaa gccccagcgc 660
ctatattaag gccatttga ataaattcta tttcccgttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 741

<210> 48

<211> 1324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

cctttccaag ggagtgggtg tgtgatcgcc atcttaggga aaagatgttc tcgtccgtgg 60
cgcacctggc gcgggcgaac cccttcaaca cgccacatct gcagctgggtg cacgatggtc 120
tcggggacct ccgcagcagc tccccagggc ccacgggccca gccccgccgc cctcgcaacc 180
tggcagccgc cgccgtggaa gagtacagtt gtgaatttgg ctccgcgaag tattatgcac 240
tgtgtggctt tgggtggggtc ttaagttgtg gtctgacaca cactgctgtg gttcccctgg 300
athtagtgaa atgccgtatg caggtggacc cccaaaagta caagggcata tttaacggat 360
tctcagttac acttaaagag gatggtgttc gtggtttggc taaaggatgg gctccgactt 420
tccttggcta ctccatgcag ggactctgca agtttggctt ttatgaagtc tttaaagtct 480
tgtatagcaa tatgcttggg gaggagaata cttatctctg gcgcacatca ctatatttgg 540
ctgcctctgc cagtgtgtaa ttctttgctg acattgccct ggctcctatg gaagctgcta 600
aggttcgaat tcaaaccag ccaggttatg ccaacacttt gagggatgca gctcccaaaa 660
tgtataagga agaaggccta aaagcattct acaaggggggt tgctcctctc tggatgagac 720
agataccata caccatgatg aagttgcct gctttgaacg tactgttgaa gcactgtaca 780
agtttgtggg tcctaagccc cgcagtgaat gttcaaagcc agagcagctg gttgtaacat 840
ttgtagcagg ttacatagct ggagtctttt gtgcaattgt ttctcaccct gctgattctg 900
tggtatctgt gttgaataaa gaaaaaggta gcagtgttc tctggtcctc aagagacttg 960
gatttaaagg tgtatggaag ggactgtttg cccgtatcat catgattggg accctgactg 1020
cactacagtg gtttatctat gactccgtga aggtctactt cagacttcct cgccctctc 1080
cacccgagat gccagagtct ctgaagaaga agcttgggtt aactcagtag ttagatcaaa 1140
gcaaatgtgg actgaatctg cttgttgatc agtgttgaag aaagtgcaaa aggaactttt 1200
atatatttga cagtgtagga aattgtctat tcctgatata attactgtag tactcttgct 1260
taaggcaaga gtttcagatt tactgttgaa ataaacccaa ctcttcatga aaaaaaaaaa 1320
aaaa 1324

<210> 49

<211> 2303

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

cggacgcgtg ggcggcgatc gcggcctgag gctgctcccg gacaagggca acgagcgttt 60
cgtttggact tctcgacttg agtgcccgcc tccttcgccg ccgcctctgc agtcctcagc 120
gcagtctttc cacaggagcc agcatacttc ctgaacatgg agagtgttgt tcgccgctgc 180
ccattcttat cccgagtcct ccaggccttt ctgcagaaag caggcaaata tctgtttgtc 240
tatgccc aaa actgccc aa gatgatggaa gttggggcca agccagcccc tcgggcattg 300
tccactgcag cagtacacta ccaacagatc aaagaaacct ctccggccag tgagaaagac 360
aaaactgcta aggccaaggt ccaacagact cctgatggat ccagcagag tccagatggc 420
acacagcttc cgtctggaca ccccttgctt gccacaagcc agggcactgc aagcaaatgc 480
cctttcctgg cagcacagat gaatcagaga ggcagcagtg tcttctgcaa agccagtctt 540
gagcttcagg aggatgtgca ggaaatgaat gccgtgagga aagaggttgc tgaaacctca 600
gcaggcccca gtgtgggttag tgtgaaaacc gatggagggg atcccagtgg actgctgaag 660
aacttccagg acattatgca aaagcaaaga ccagaaagag tgtctcatct tcttcaagat 720
aacttgccaa aatctgtttc cacttttcag tatgatcgtt tctttgagaa aaaaattgat 780
gagaaaaaga atgaccacac ctatcgagtt tttaaaactg tgaaccggcg agcacacatc 840
ttcccatgg cagatgacta ttcagactcc ctcatcacca aaaagcaagt gtcagtctgg 900
tgcagtaatg actacctagg aatgagtcgc caccacggg tgtgtggggc agttatggac 960
actttgaaac aacatgggtc tggggcaggt ggtactagaa atatttctgg aactagtaaa 1020
ttccatgtgg acttagagcg ggagctggca gacctccatg ggaaagatgc cgcactcttg 1080
ttttcctcgt gctttgtggc caatgactca accctcttca ccctggctaa gatgatgcca 1140
ggctgtgaga ttactctga ttctgggaac catgcctcca tgatccaagg gattcgaaac 1200
agccgagtgc caaagtacat cttccgccac aatgatgtca gccacctcag agaactgctg 1260
caaagatctg acccctcagt cccaagatt gtggcatttg aaactgtcca ttcaatggat 1320
ggggcggtgt gccactgga agagctgtgt gatgtggccc atgagtttgg agcaatcacc 1380
ttcgtggatg aggtccacgc agtggggctt tatggggctc gaggcggagg gattggggat 1440

cgggatggag tcatgccaaa aatggacatc atttctggaa cacttggcaa agcctttggt 1500
tgtgttggag ggtacatcgc cagcacgagt tctctgattg acaccgtacg gtcctatgct 1560
gctggcttca tcttcaccac ctctctgcca cccatgctgc tggctggagc cctggagtct 1620
gtgcggatcc tgaagagcgc tgagggacgg gtgcttcgcc gccagcacca gcgcaacgtc 1680
aaactcatga gacagatgct aatggatgcc ggcctccctg ttgtccactg cccagccac 1740
atcatccctg tgcgggttgc agatgctgct aaaaacacag aagtctgtga tgaactaatg 1800
agcagacata acatctacgt gcaagcaatc aattacccta cggtgccccg gggagaagag 1860
ctcctacgga ttgccccac ccctcaccac acaccccaga tgatgaacta cttccttgag 1920
aatctgctag tcacatggaa gcaagtgggg ctggaactga agcctcattc ctcagctgag 1980
tgcaacttct gcaggaggcc actgcatttt gaagtgatga gtgaaagaga gaagtcctat 2040
ttctcaggct tgagcaagtt ggtatctgct caggcctgag catgacctca attatttcac 2100
ttaaccccag gccattatca tatccagatg gtcttcagag ttgtctttat atgtgaatta 2160
agttatatta aatittaatc tatagtaaaa acatagtcct ggaaataaat tcttgcttaa 2220
atggtgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2303

【0070】

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト食道癌由来のcDNAクローンである、KE4-cl.17 (図中-●-)、KE4-cl.18 (図中-■-)、およびKE4-cl.21 (図中-▲-)が、用量依存的にHLA-A26拘束性細胞傷害性T細胞株KE4-CTLに認識され、KE4-CTLからのIFN- γ 産生を促進することを示す図である。

【図2】 ヒト大腸癌由来のcDNAクローンである、SW620-cl.48およびSW620-cl.121が、それぞれ用量依存的にHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞株OK-CTLに認識され、OK-CTLからのIFN- γ 産生を促進することを示す図である〔それぞれ図2の(A)および(B)〕。

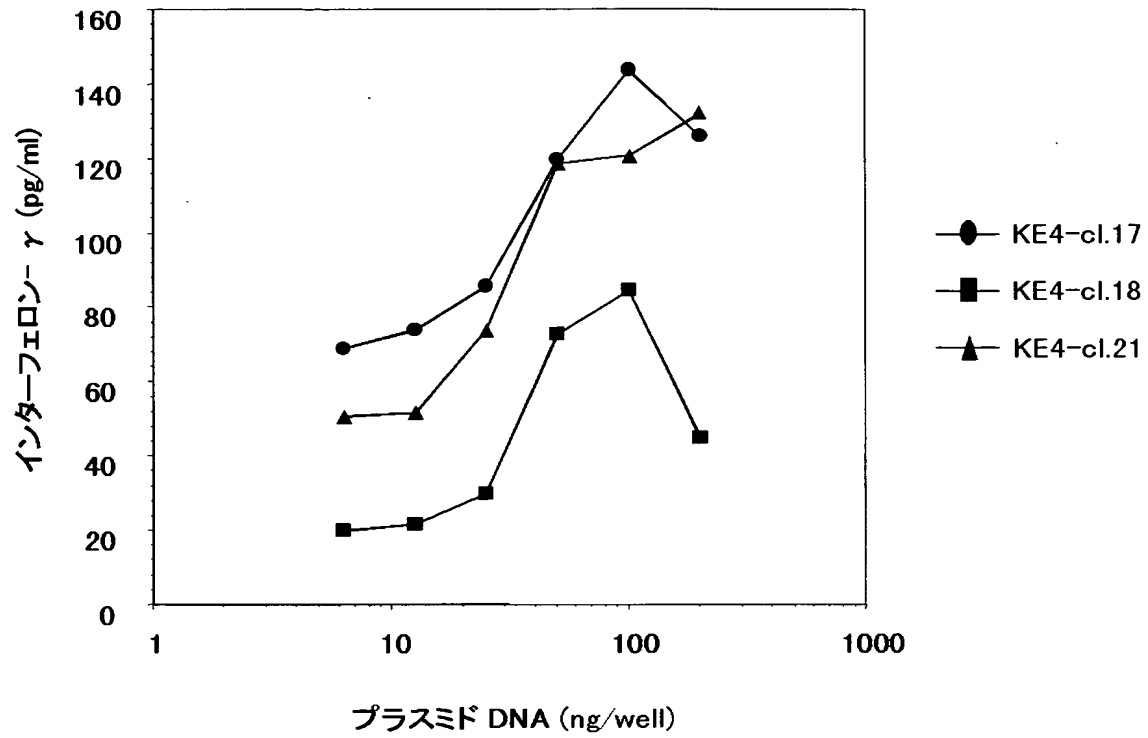
【図3】 KE4-cl.21由来のペプチドが、用量依存的にHLA-A26拘束性細胞傷害性T細胞株KE4-CTLに認識され、KE4-CTLからのIFN- γ 産生を促進することを示す図である。図3の(A)および(B)は、2回行った実験の結果をそれぞれ示す。図3の(A)において、-●-はKE4-21・P28を、-▲-はKE4-21・P29を、-■-はKE4-21・P39を、および-○-はKE4-21・P40を示す。図3の(B)において、-●-はKE4-21・P28を、-▲-はKE4-21・P38を、-○-はKE4-21・P40を、および-■-はKE4-21・P47を示す。

【図4】 SW620-cl.48由来のペプチドが、用量依存的にHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞株OK-CTLに認識され、OK-CTLからのIFN- γ 産生を促進することを示す図である。図中、-●-はSW620-48・P162を、-■-はSW620-48・P163を、-▲-はSW620-48・P165を、-○-はSW620-48・P166を、-□-はSW620-48・P173を、および-△-はSW620-48・P174を示す。

【書類名】

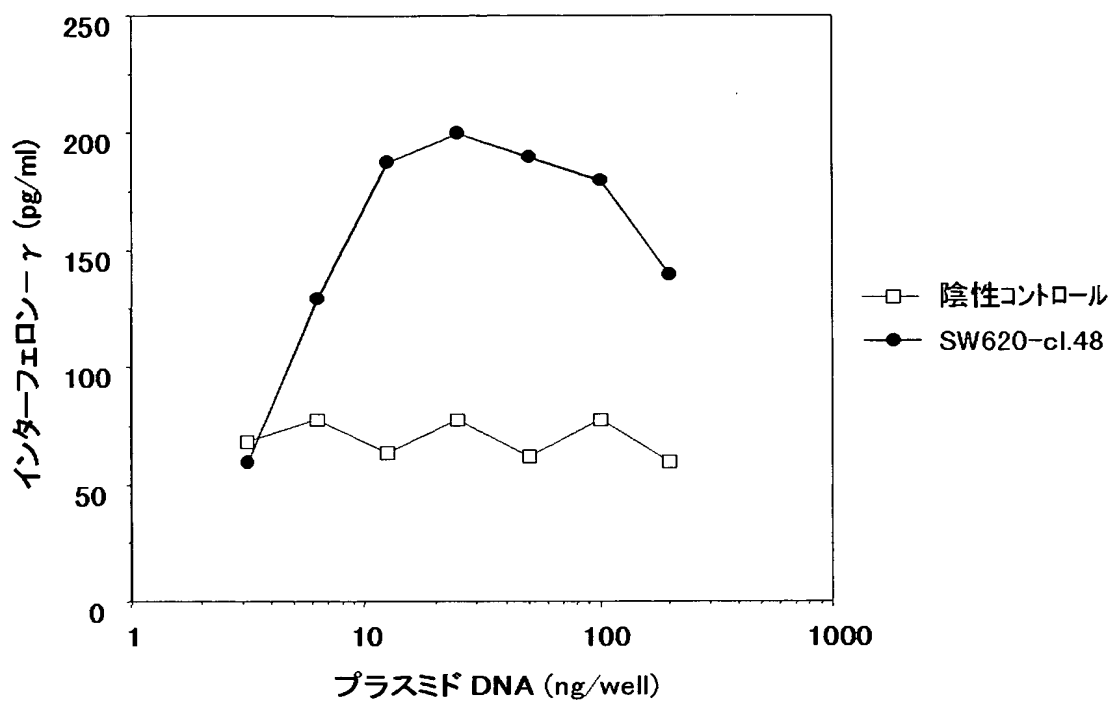
図面

【図 1】

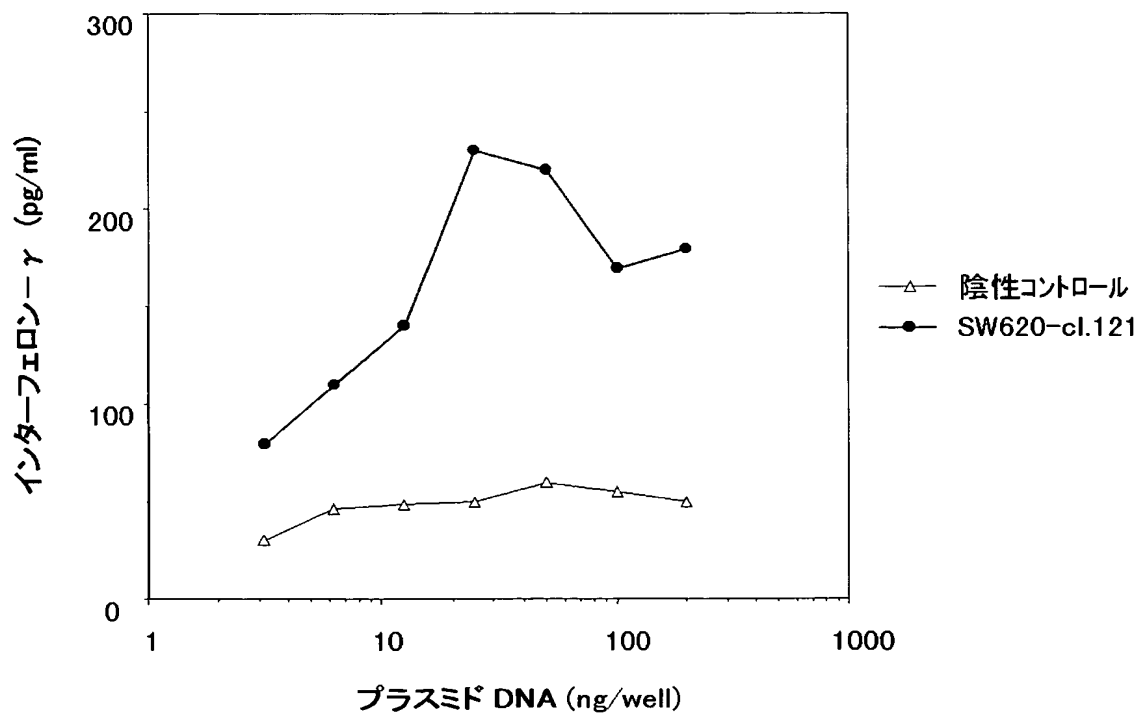


【図 2】

(A)

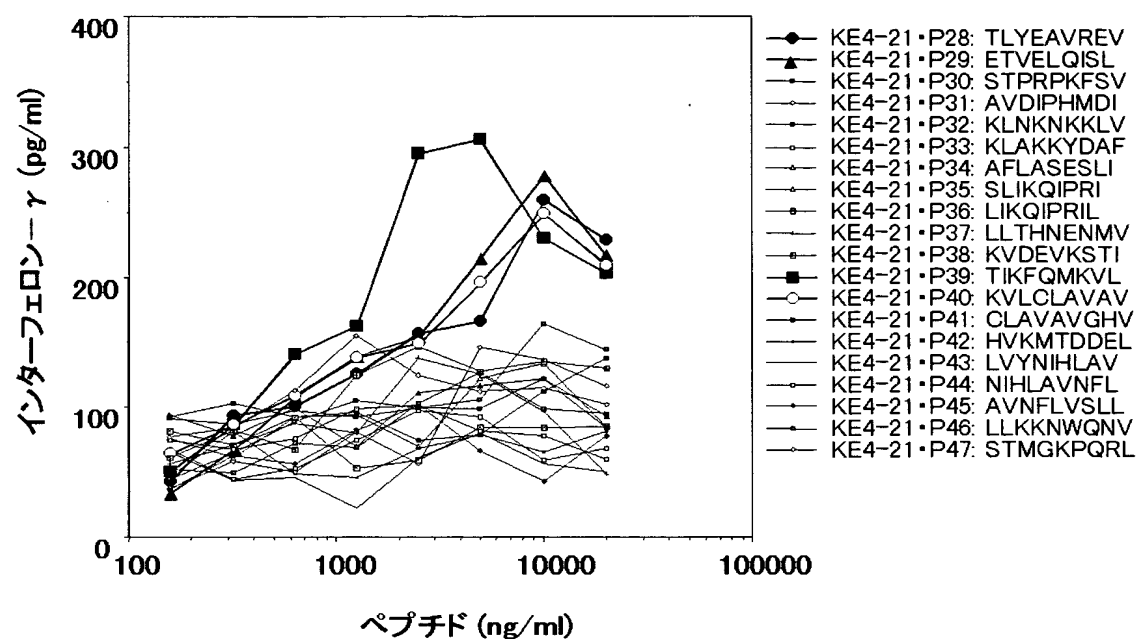


(B)

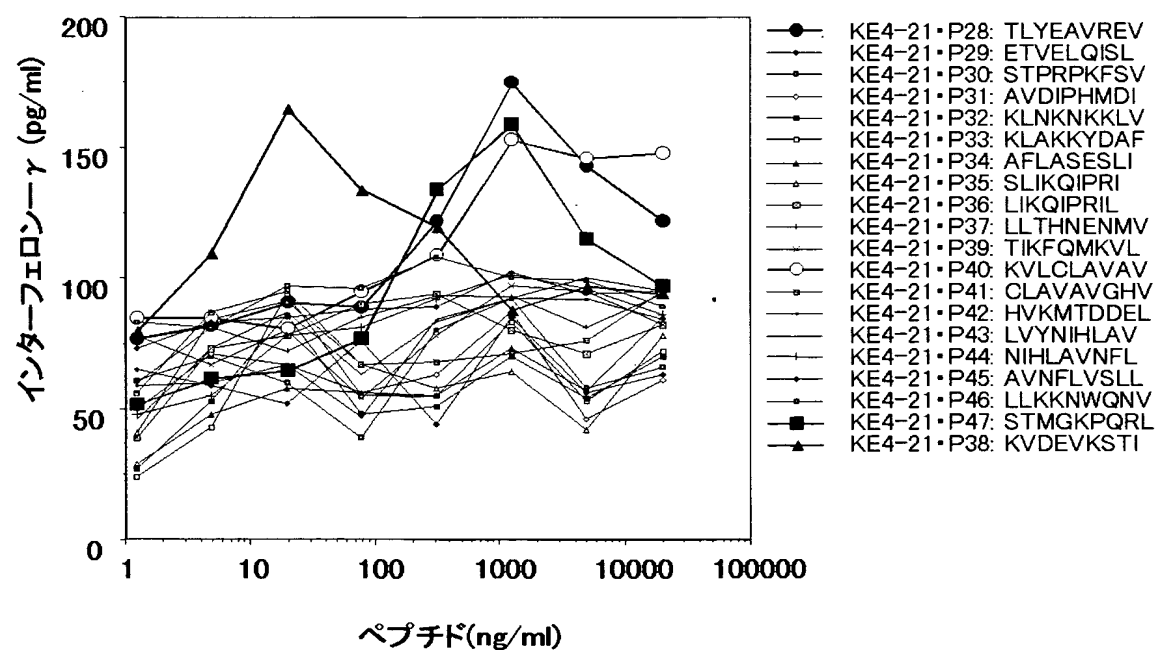


【図3】

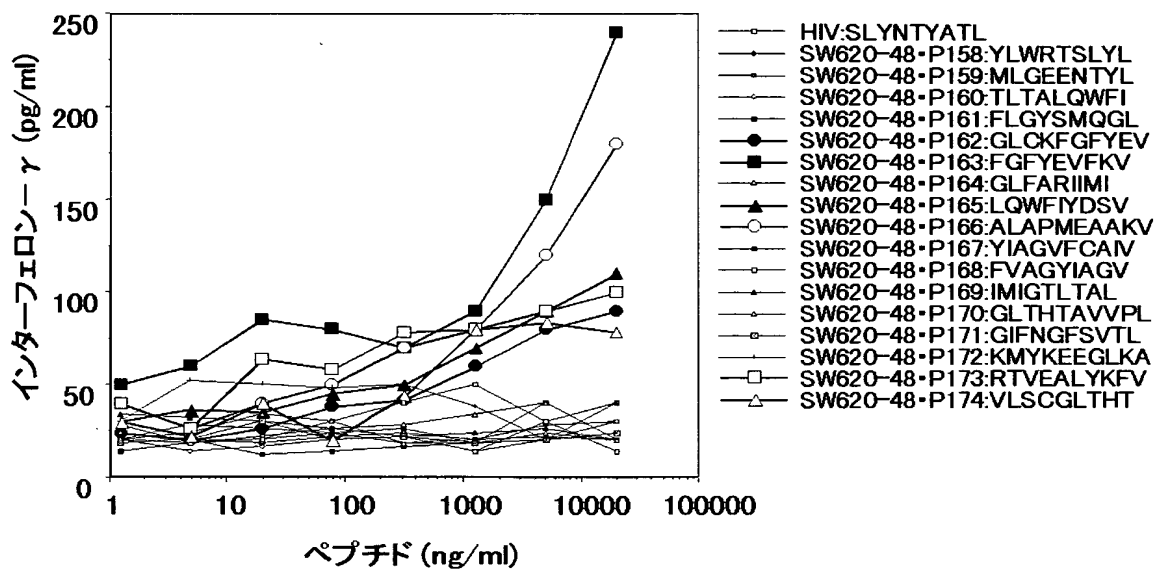
(A)



(B)



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腫瘍特異的細胞傷害性T細胞により認識される分子（腫瘍抗原）を見い出すこと。

【解決手段】 ヒト食道癌患者またはヒト大腸癌患者由来の腫瘍浸潤リンパ球から、それぞれHLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を樹立し、これらの腫瘍特異的細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、ヒト食道癌細胞株KE4またはヒト大腸癌細胞株SW620のcDNAライブラリーから同定し、さらにHLA-A26拘束性またはHLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞により認識される、該腫瘍抗原のエピトープを有するペプチドを見い出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 2 5 0 7 2 8
受付番号	5 0 1 0 1 2 2 2 4 6 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 3 年 8 月 2 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成13年 8月21日
-------	-------------

次頁無

特願 2001-250728

出願人履歴情報

識別番号

[596094371]

1. 変更年月日
[変更理由]

1996年 6月 7日

新規登録

住 所
氏 名

佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
伊東 恭悟

